

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-246382

⑬ Int. Cl.⁴

C 07 D 495/04
G 01 N 33/68

識別記号

1 0 3

庁内整理番号

8615-4C
8305-2G

⑭ 公開 昭和63年(1988)10月13日

審査請求 未請求 発明の数 2 (全5頁)

⑮ 発明の名称 ビオチニル試薬及びそれを用いるビオチニル化法

⑯ 特 願 昭62-79600

⑰ 出 願 昭62(1987)4月2日

⑱ 発 明 者 林 良 雄 東京都渋谷区恵比寿南2丁目4番1号 カルビス食品工業株式会社研究開発センター内

⑲ 発 明 者 江 沢 邦 夫 東京都渋谷区恵比寿南2丁目4番1号 カルビス食品工業株式会社研究開発センター内

⑳ 出 願 人 カルビス食品工業株式会社 東京都渋谷区恵比寿西2丁目20番3号

㉑ 代 理 人 弁理士 戸田 親男

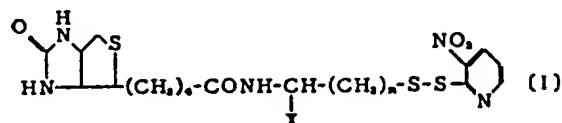
明 細 書

1. 発明の名称

ビオチニル試薬及びそれを用いるビオチニル化法

2. 特許請求の範囲

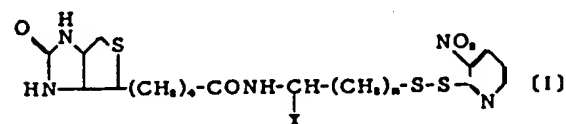
1. 次の式(1)



(但し式中Xは-COO⁻、-CONH₂又は水素原子であり、nは1~10の整数を表わす)

で示される化合物からなるビオチニル化試薬。

2. 次の式(1)



(式中Xは-COO⁻、-CONH₂又は水素原子であり、nは1~10の整数を表わす)

で示される化合物からなるビオチニル化試薬と

SH基を有する物質あるいは前もって還元またはSH基導入によりSH基を生じさせた物質とを反応させ、該物質をビオチニル化することを特徴とするビオチニル化法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は新規なSH基特異的ビオチニル化試薬及びそれを用いる生理活性物質のビオチニル化法に関するものである。

本発明で得られるビオチニル試薬は、現在行なわれている種々のアビジン-ビオチンシステムにきわめて有利に利用できる。したがって本発明は、免疫分析その他の生体内微量分析、化学分析のほか、生理活性物質の精製の技術分野においても適用されるものである。

(従来の技術)

従来、種々のアッセイ系や生理活性物質の精製において、その感度を高める目的でアビジンとビオチンの親和性を利用したシステムが開発されている。そして、ビオチン模倣物質はこの系におい

て、必須である(「化学大辞典」共立(昭42-9-10) p221)。

生理活性物質のビオチニル化は、一般に生理活性物質分子中の数種の官能基に対してそれぞれに活性なビオチニル化試薬を用いて行なわれる。その主なものは①アミノ基に反応性を有する例えばd-ビオチニル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルなどであり、他の活性エステルも用いられている。

その他には②光反応を利用して非選択的にビオチニル化するフォトビオチン、③フェノールやイミダゾールに反応性を有するジアソニウム塩をもつもの、④SH基に反応性を有する有機水銀を有するビオチンあるいはアルキルハライドを有するビオチン等が挙げられる。

(発明が解決しようとする問題点)

これらの試薬は、それぞれ有用な物質ではあるが次の様な欠点は不可避である。

1. 従来主に使用されていた上記①の試薬は、蛋白質に組み込まれる場合、不特定多数のアミノ

基に対してビオチンが導入されるため、蛋白質によっては活性に重要なアミノ基の修飾が起り、蛋白質の活性の低下がみられる。

2. 上記②③も、同様のことがえる。特に②の試薬では、その特異性が低く特異的な修飾には向かない。

3. 上記④の試薬は、SH基に対してビオチニル化を行なうものである。しかしながら、有機水銀とSH基との反応は、その選択性も高いが蛋白質に使用した時SH基のみでなく他の官能基に結合することが報告されている。(Klapper, N.H., B.B.R.C.(バイオケミカル バイオフィジカル リサーチ コミュニケーション), 38, 172(1970), Duke, J., et.al., (1971) B.B.A(バイオケミカル, バイオフィジカルアクト) 229, 155など)

また、水銀化合物の為その取り扱いや廃棄にも問題があった。更にハロゲン化アルキルとSH基の反応は、選択性が低く、イミダゾール基、アミノ基、チオエーテル基、フェノール基とも反応性を有し、反応条件の設定が難しい。

(問題点を解決するための手段)

本発明は、上記した欠点を解決するためになされたものであって、高い反応性で特異的に生理活性物質をその活性を低下させずにビオチニル化でき、なおかつ、水性及び有機性兩媒それぞれに対し高い溶解性を有する安定で安全なビオチニル化試薬をスクリーニングした。しかしながら、既知の化合物の中には目的とするビオチニル化試薬は見ることができなかった。

そこで、発想を転換して、新規化合物の中から目的化合物を開発する以外に途がないとの観点にたった。そして、鋭意研究の結果、新規化合物を合成するに当り、先ず第一に、ビオチニル化の標的としてSH基を選択した。蛋白質においてSH基は、多くはジスルフィドの形で存在し、蛋白質の骨格形成に関与しており、比較的機軸中心に少ないこと。また分子中のSH基の数も他の官能基に比べると少ないこと。そしてこれらのことは、SH基のビオチニル化は、蛋白の機軸の低下をまねきにくく、更に、計画的な、特異性をもたせたビオチニル化

を可能にすると考えられることから、ビオチニル化の標的としてSH基を選択したのである。

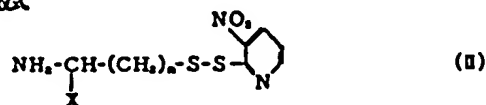
そして第二に、SH反応性の特異性を増すために、チオール基の修飾物質中最も特異性の高い、高反応性ジスルフィドを反応性基として選び、各種の新規化合物を数多く合成した。その中で、特に一般式(1)で示される新規化合物が安定性、溶解性にすぐれており生理活性物質中のチオール基の特異的ビオチニル化に有用であるという知見を得、本発明に到達した。

すなわち本発明は、一般式(1)で示される化合物を、SH基に特異的なビオチニル化試薬として使用する点を重要なポイントとするものである。この化合物は、それ自体、文献未載の新規化合物であり、これがビオチニル化試薬として利用できることも従来未知の新規事項である。

本発明において、SH基を有する生理活性物質とは、分子内に元来SH基を有するか、ジスルフィド結合の還元により生じたSH基を有するものか、あるいは、新たに導入されたSH基を有するものであ

り、例えば蛋白質、糖蛋白質、天然及び合成ペプチド、天然及び合成重合体等の高分子物質、及び例えばSH基を有する低分子化合物を広く意味する。

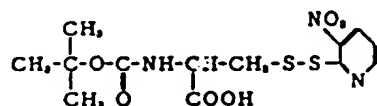
前記一般式(1)で示される本発明の化合物は一般式



(但し式中Xは-COO⁻、-CONH₂、又は水素原子であり、nは1~10の整数を表わす)をd-ビオチニル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル

(III)と反応させることにより得ることができる。上記の反応は、適当な溶媒の存在下で一般式(II)と(III)を接触させることにより容易に進行される。

なお、上記原料化合物である式(II)の化合物は、例えば次式で示されるN-t-ブトキシカルボニル-S-3-ニトロ-2-ピリジルスルフェニルシステインを、(Boc-Cys(NPYS)として市販)



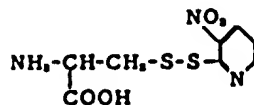
を抑えて目的化合物の収率を高めるためには比較的低温で反応を行うのが好ましく、通常約0℃ないし室温で行なわれる。反応に要する時間は、アミン成分、溶媒の種類、反応温度によっても異なるが1~2日で反応は完結する。

反応終了後、前記一般式(1)を有する本発明の化合物は、常法によって、反応混合物から採取される。例えば反応混合物を濾過し、濾液より溶媒を減圧留去し、残渣を有機溶媒で洗滌した後、水に溶かし、ゲル濾過で精製することにより高純度のものが得られる。

次に、SH基を有する物質への本発明の化合物の導入、つまりビオチニル化は、両者を適当な溶媒の存在下に接触することにより容易に進行される。

使用される溶媒としては、本反応に悪影響を与えないものであれば特に制限はない。本反応は、SH基を有する物質の性質により水性溶媒中でも有機溶媒中でも行なえるが、溶媒の好適な例としては、水性溶媒であれば種々の緩衝液、有機溶媒であればジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキ

例えば酸で処理することによって容易に得られ、例えば式(II)(X=COOH)の化合物が得られるのである。



上記した化合物(II)と(III)の反応において、使用される溶媒としては、本反応に悪影響を与えないものであれば特に限定はない。そのような溶媒の好適な例としては、ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン、ジメチルスルホキシド等があげられる。d-ビオチニル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(III)の反応当量は、化学的理論量でよいが、反応を速やかに進行させて目的化合物の収率を高めるために過剰量を使用するのが好ましく、アミン成分(II)1モルに約1.2ないし1.5モル程度の使用が好ましい。また、反応をより早くすすめるために、触媒としてHOBt(N-ヒドロキシベンゾトリアゾール)を約0.1当量加えてもよい。反応温度に特に限定はないが、副反応

シド、テトラヒドロフラン等があげられる。

水性溶媒のpHは特に限定しないが、好適な例としては4~9の範囲がよい。

一般式(1)のSH基に対する反応当量は化学的理論量でよいが、反応を速やかに進行させ目的物の収率を高めるために過剰量を使用するのが好ましく、SH基1モルに対し約1.2ないし10モル程度の使用が好ましい。反応温度に特に限定はないが、副反応を抑えて目的物の収率を高めるためには、比較的低温で反応を行うのが好ましく通常約0℃ないし室温で行なわれる。反応に要する時間はSH基を有する物質や溶媒の種類、反応温度によっても異なるが数分~数時間で完結する。

反応終了後、ビオチニル化された物質は、常法によって反応混合物から採取される。例えば、反応液をそのままカラムにかけ分離することにより高純度のものが得られる。

このようにしてビオチニル化された物質は、アビジン-ビオチンシステムにより各種の用途に広範に使用することができる。

以下、実施例及び応用例により本発明をより詳しく説明するが本発明はこれに限定されるものではない。

実施例 1

N-d-ビオチニル-S-3-ニトロ-2-ビリジルスルフェニル-L-システインNa塩

N-t-ブトキシカルボニル-S-3-ニトロ-2-ビリジルスルフェニル-L-システイン413mgを、アニソール360μlの存在下0℃でトリフルオロ酢酸2mlを加え、攪拌する。90分後、室温でトリフルオロ酢酸を減圧留去し、油状物を得る。これを、氷冷下、ジメチルホルムミド10mlに溶かし、攪拌下トリエチルアミンを加えて中和し、更に1当量のトリエチルアミンを加える。

アミン成分が析出するが、そのままd-ビオチン-N-ハイドロキシスクシンイミドエステル340mgを加えて攪拌する。反応が進むに従い、アミン成分は徐々に消ける。72時間攪拌後、微量の不溶物を遠去し、溶媒を減圧留去後、残液を水に溶かし、酢酸エチルで洗浄する。水層をNa₂CO₃でpH 8にし、

したSH基のビオチニル化を行った。

C1q 2mgを含む、0.05Mトリス(ヒドロキシアミノメチル)アミノメタン、1M塩化ナトリウム、0.005EDTA、10%スクロースの水溶液(pH7.4) 1mlに、0.1Mジチオスレイトール10μlを加え、室温下、60分間ゆるやかに攪拌し、反応液をセファデックスG-25カラムに通し、蛋白質画分を回収する。この蛋白質画分を、限界濾過で約1.5mlまで濃縮し、これを、氷冷下、ゆるやかに攪拌しながら、25μgの実施例1で得たN-d-ビオチニル-S-3-ニトロ-2-ビリジルスルフェニル-L-システインNa塩を加える。4℃でそのまま10分間攪拌する。反応の終了をUV352nmにおける吸収の消失により確認後、セファデックスG-25カラムに通し、蛋白質画分4mlを(OD、0.201)回収することによりビオチニル化標識C1qが得られる。

応用例 1

合成したビオチニルC1qのELISA系への応用

ウシ血清アルブミンを20μg/mlの濃度で磷酸緩衝食塩液に溶解し、96穴マイクロタイタープレ

水を溶出液とするセファデックスG-15カラムでゲル濾過し、目的物の画分を分収し、凍結乾燥することにより目的化合物が黄色毛羽状粉末として70%の収量で得られる。

融点 132~133℃(dec.)

RI 0.31(CHCl₃ : MeOH : AcOH = 9 : 1 : 0.5)

紫外吸収スペクトル

UV_{Max}^{H₂O}nm(ε) : 352(2708), 272(5940), 227(10920)

赤外吸収スペクトル

IR_{Max}^{KBr}cm⁻¹ : 1710, 1700, (-NH-C(=O)-NH-, -NH-C(=O)-), 1600(-COO⁻), 1520, 1340(-NO₂)

実施例 2

N-d-ビオチニル-S-3-ニトロ-2-ビリジルスルフェニル-L-システインNa塩による補体第一成分C1qのビオチニル化

補体第一成分C1qは、分子量約40万の糖蛋白質であり、補体結合性抗原抗体複合体に特異的に結合する性質を有する。C1qは、その分子内のアミノ基を修飾すると失活する。そこでC1q分子内にあるジスルフィド結合を還元することにより生成

ートに200μlずつ分注し、室温で2時間保持しウエルに吸着させた。

遊離のウシ血清アルブミンを除いた後、ゼラチン・ペロナル緩衝液を分注し、室温で3時間保持した。これを除いた後に、ウサギ抗ウシ血清アルブミン抗血清(ゼラチン・ペロナル緩衝液で100~3200倍に段階希釈) 50μlおよびビオチニルC1q(ゼラチン・ペロナル緩衝液で50倍希釈) 50μlを加え、室温60分静置した。

各ウエルを洗浄後、これにアビジン-パーオキシダーゼ(PBSで200倍希釈) 50μlを加え、室温で30分静置し、上で述べたように洗浄した各ウエルにパーオキシダーゼの基質であるABTS(2,2'-アジノジ(3-エチルベンズチアゾリン)-6'-スルホン酸)/H₂O₂ 100μlを加え、30分間発色させて414nmの吸収を測ることにより、抗ウシ血清アルブミン抗血清の濃度に相関した吸光度が0.01793~0.060の値で得られた。

(発明の効果)

本発明のビオチニル試薬は、従来のビオチニル

化試薬と異なり各種生理活性物質を 真的に且つ安定にビオチニル化することが出来るものである。

そして特にアビジンとの相互作用によって、免疫分析、酵素免疫分析、その他のバイオアッセイ、各種化学分析が好適に実施できるのみでなく、各種生理活性物質の分離精製もきわめて容易にできる。

したがって本発明は、バイオテクノロジー、医療、生化学、診断、検査、分析といった広い技術分野で重要な役割を果たすものである。

代理人 弁護士 戸 田 銀 男